

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA RESPOSTA ESTRINGENTE NA ADAPTAÇÃO DE *BACILLUS SUBTILIS* À INIBIÇÃO DE SÍNTESE DE FOSFOLIPÍDEOS

Lincon Lopes Raigon Junior

Kattlyn Laryssa Candido

Frederico José Gueiros Filho

Universidade de São Paulo

linconjr@usp.br

Objetivos

Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos da inibição da síntese de fosfolipídios sobre o crescimento e a viabilidade de *Bacillus subtilis*. A síntese de fosfolipídeos será interrompida pela depleção da enzima PlsX, uma acil-transferase responsável pela primeira etapa da síntese de fosfolipídeos em bactérias Gram-positivas. Pretende-se determinar se a célula apresenta mecanismos adaptativos à depleção dessa enzima e, em caso afirmativo, avaliar o papel da resposta estringente na manutenção da viabilidade celular. Caso a resposta estringente seja essencial para a adaptação, será identificada qual(is) das sintetases de (p)ppGpp está(ão) envolvida(s) na resposta à inibição de PlsX.

Métodos e Procedimentos

Será construído um conjunto de linhagens mutantes derivadas de uma cepa parental na qual o gene de *plsX* está sob controle do promotor indutível por xilose ($P_{xyt}\text{-}plsX$). As demais linhagens consistirão em mutantes com deleções combinatórias das sintetases de (p)ppGpp, incluindo: (i) $\Delta relP\Delta relQ$ (ou ΔSAS), (ii) $\Delta relP\Delta relQ\Delta rel$ ($\Delta 3$) e (iv) mutante pontual que abole a atividade de síntese de Rel (rel^{D264G}).

A viabilidade celular das diferentes linhagens será avaliada após a interrupção da expressão de *plsX*, pelo crescimento na ausência do

indutor xilose. O crescimento bacteriano será monitorado por medidas de densidade óptica a cada hora, enquanto a viabilidade será quantificada através de plaqueamento para determinação de unidades formadoras de colônias (UFC). Esta abordagem permitirá avaliar a dependência de PlsX em diferentes contextos de síntese de (p)ppGpp.

Tabela 1. Tabela com os códigos e genótipos das cepas usadas no trabalho.

Código	Genótipo
PY79	Cepa selvagem.
FG2535	PY79/ <i>manPA::Pxyl-plsX, kn</i>
FG2556	PY79/ <i>manPA::Pxyl-plsX, kn; relP::erm relQ::cat</i>
FG2577	PY79/ <i>manPA::Pxyl-plsX, kn; relP::erm relQ::cat relBs::phleo</i>
FG2592	PY79/ <i>manPA::Pxyl-plsX, kn relBs D264G</i>

Resultados

Ao inibir a síntese de PlsX na cepa $P_{xyt}\text{-}plsX$, a população bacteriana apresenta uma parada de crescimento após cerca de 90 minutos (Figura 1), a qual é explicada pela parada da síntese de fosfolipídeos. Em seguida, testou-se

a viabilidade (Figura 2), que indica que as células que param de crescer se mantêm viáveis, sugerindo a presença de um mecanismo de adaptação no caso de depleção de PlsX.

Em seguida, para verificar um possível papel de (p)ppGpp na adaptação à falta de fosfolipídeos, foi conduzido o experimento com FG2577 ($\Delta 3$). Na Figura 1, a curva de crescimento foi semelhante a de $P_{xyr}plsX$, no entanto, no teste de viabilidade não houve aparecimento de UFCs, o que sugere grande perda de viabilidade.

Assim, para analisar o papel das SAS na regulação, conduzimos o experimento com FG2556 (ΔSAS), e o comportamento de crescimento foi semelhante ao das demais. Ao verificar a viabilidade em condições de depleção (Figura 2), ΔSAS se mantém vivo, descartando RelP e RelQ como enzimas responsáveis por sinalizar à célula a ausência de fosfolipídios.

A seguir, testou-se o mutante FG2592 (D264G). Esta linhagem visa avaliar o papel da sintetase longa, Rel_{Bs} , na regulação celular à carência de fosfolipídios. Novamente, na Figura 1, o crescimento seguiu conforme a tendência geral; no entanto, na Figura 2, a cepa D264G se mostrou viável, sugerindo que Rel_{Bs} não é responsável por regular a resposta estringente na carência de fosfolipídios.

Posto isso, os resultados de $\Delta 3$ e D264G se mostraram contraditórios, visto que o triplo mutante perde viabilidade enquanto o mutante pontual se mantém vivo. Em seguida, é necessário testar novamente a viabilidade das linhagens $\Delta 3$ e D264G e realizar microscopia para complementar os dados.

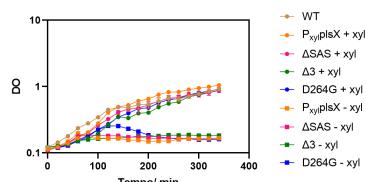


Figura 1: Gráfico de crescimento dos mutantes

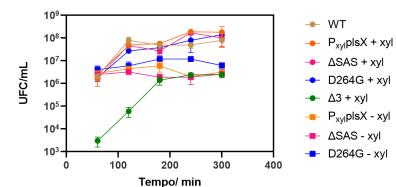


Figura 2: Gráfico de viabilidade dos mutantes

Conclusões

Os dados obtidos até o momento indicam que a depleção de PlsX em *Bacillus subtilis* não resulta em morte celular. O perfil de viabilidade da linhagem FG2535 ($P_{xyr}plsX$), apresentado na Figura 2, sugere a existência de um mecanismo adaptativo que sustenta a sobrevivência celular na ausência de PlsX.

A hipótese de que a resposta estringente medeia essa adaptação foi investigada utilizando o mutante triplo, FG2577 ($P_{xyr}plsX \Delta 3$), cujo resultado sugere uma possível relação entre síntese de (p)ppGpp e viabilidade celular. Os resultados das linhagens ΔSAS e D264G não indicam qual das três sintetasas é responsável por essa adaptação, sugerindo uma ação conjunta entre as três.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

O orientador Frederico Gueiros Filho concebeu o projeto e a doutoranda Kattlyn Candido planejou o estudo. O aluno de iniciação científica Lincon Lopes realizou a coleta de dados. Em conjunto, Frederico Gueiros Filho, Kattlyn Candido e Lincon Lopes analisaram os dados. Lincon Lopes realizou a redação, Frederico Gueiros Filho e Kattlyn Candido participaram da revisão final do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do resumo.

Agradecimentos

O projeto recebeu auxílio do PIBIC ligado ao CNPq.